

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Oktober 2001 (04.10.2001)

PCT

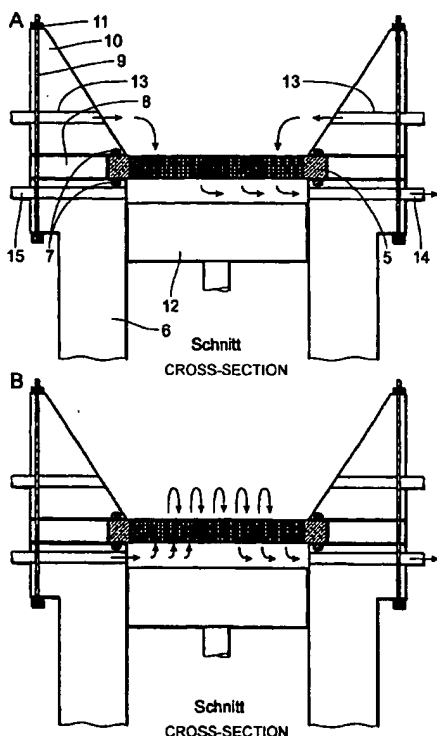
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/72412 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: B01J 19/00, 200 05 738.3 28. März 2000 (28.03.2000) DE
C07K 1/04, C07H 21/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03530
- (22) Internationales Anmeldedatum:
28. März 2001 (28.03.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 15 391.7 28. März 2000 (28.03.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LASER- UND MEDIZIN-TECHNOLOGIE GMBH BERLIN [DE/DE]; Fabeckstr. 60-62, 14195 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FREY, Andreas [DE/DE]; Am Pastorenbusch 10, 48161 Münster (DE). HELFMANN, Jürgen [DE/DE]; Clara-Zetkin-Str. 22, 14532 Kleinmachnow (DE). SCHMIDT, Marcus, Alexander [DE/DE]; Piperfeldweg 116, 48329 Harisebeck

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR INVESTIGATING THE MOLECULAR INTERACTION OF SOLUBLE OR SUSPENDABLE ACTIVE SUBSTANCES WITH SOLID-PHASE BONDED PEPTIDIC OR PEPTOID TARGET MOLECULES BY MEANS OF CAPILLARY PLATES HAVING A LARGE INNER SURFACE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR UNTERSUCHUNG DER MOLEKULAREN WECHSELWIRKUNGEN VON LÖSLICHEN ODER SUSPENDIERBAREN WIRKSTOFFEN MIT FESTPHASEN-GEBUNDENEN PEPTIDISCHEN ODER PEPTOIDEN ZIELMOLEKÜLEN DURCH KAPILLARPLATTEN MIT GROSSER INNERER OBERFLÄCHE



(57) Abstract: The aim of the invention is to investigate the bonding of substances to target molecules. This is achieved by means of a densely packed device wherein various target molecules are bonded in a large number of sample areas. Cross-contamination and evaporation need to be minimized. The active surface of the sample areas have to be maximized. The inventive solution resides in the use of carrier plates, containing densely packed capillary structures and having a very large inner surface despite small outer dimensions. 1000 times more molecules can be bonded than on a flat outer surface of a comparable size. Cross contamination is avoided by the lack of cross links between the capillaries. Evaporation is minimized by a small outer surface. After the inner surface of the capillaries has been silanized, peptides and peptidomimetics are synthesized in a locally targeted manner. The molecular interactions of components of the substance library with active substances in a solution or a suspension are investigated by means of a local resolution optical detection method. Handling, especially cleaning and covering with substances, is carried out in a simple manner by rinsing liquids through the capillary plate.

(57) Zusammenfassung: Zur Untersuchung der Bindung von Substanzen an Zielmoleküle wird eine dichtgepackte Anordnung gesucht, bei der in vielen Probenarealen jeweils unterschiedliche Zielmoleküle gebunden sind. Eine Kreuzkontamination sowie die Verdunstung ist zu minimieren, die aktive Oberfläche der Probenareale zu maximieren. Die erfindungsgemässe Lösung besteht in der Verwendung von Trägerplatten, die

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/72412 A1



(DE). MÜLLER, Gerhard [DE/DE]; An der Rehwiese 8, 14129 Berlin (DE).

(74) **Anwalt: EISENFÜHR, SPEISER & PARTNER**; Pacellallee 43/45, 14195 Berlin (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** JP, US.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

eine dichte Packung von Kapillarstrukturen enthalten und somit eine sehr grosse innere Oberfläche bei kleinen äusseren Abmessungen besitzen. Hiermit können 1000-fach mehr Moleküle gebunden werden als an einer flachen äusseren Oberfläche vergleichbarer Grösse. Die Kreuzkontamination wird durch das Fehlen von Querverbindungen zwischen den Kapillaren verhindert, die Verdunstung durch eine kleine äussere Oberfläche minimiert. Nach Silanisierung der inneren Kapillaroberfläche werden darauf ortsgerichtet Peptide und Peptidomimetika synthetisiert. Die Untersuchung der molekularen Wechselwirkungen von Komponenten der Substanzbibliothek mit in Lösung oder Suspension befindlichen Wirkstoffen erfolgt durch ortsauflösende optische Detektionsverfahren. Die Handhabung, insbesondere Reinigung und Belegung mit Substanzen, geschieht einfach durch Durchspülen von Flüssigkeiten durch die Kapillarplatte.

Verfahren und Vorrichtung zur Untersuchung der molekularen Wechselwirkungen von löslichen oder suspendierbaren Wirkstoffen mit festphasen-gebundenen peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen durch Kapillarplatten mit großer innerer Oberfläche

Im Gegensatz zu festphasen-immobilisierten miniaturisierten Nukleinsäurebibliotheken, über die eine Vielzahl von Publikationen in Fachzeitschriften und Patenten existieren (S.P.A. Fodor et al. (1991), Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *science* 251:767-773; E.M. Southern et al. (1992), Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics* 13:1008-1017; G. McGall. et al. (1996), Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 26:13555-13560; M. Chee et al. (1996), Accessing genetic information with high density DNA arrays. *Science* 274:610-614; 5. Singh-Gasson et al. (1999), Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat. Biotechnol.* 17:974 -978; S.P.A. Fodor et al. (1995), Arrays of materials attached to a

substrate. US 5744305; S.P.A. Fodor et al. (1995), Very large scale immobilized polymer synthesis. US 5424186; G.H. McGall et al. (1995), Spatially-addressable immobilization of oligonucleotides and other biological polymers on surfaces. US 5412087, A.S. Heuermann (1999), Method and device for photolithographic production of DNA, PNA and protein chips. WO 9960156A2, G.H. McGall und N.Q. Nam (2000), Synthesis of oliganucleotide arrays using photocleavableprotecting groups. US 6022963) sind festphasen-immobilisierte stark miniaturisierte Peptid- oder Peptidomimetika-Bibliotheken bislang nur in wenigen Arbeiten beschrieben worden (S.P.A. Fodor et al. (1991), Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 25 1:767-773; C.P. Holmes et al. (1995), The use of light-directed combinatorial peptide synthesis in epitope mapping. Biopolymers 3 7:199-211; M.C. Pirrung et al. (1992), Large scale photolithographic solid phase synthesis of polypeptides and receptor binding thereof US 5143854, M.C. Pirrung et al. (1995), Large scale photolithographic solid phase synthesis of an array of polymers. US 5405783).

Einer der Hauptgründe, warum miniaturisierte Peptidbibliotheken, sog. "Peptid-Chips", bislang noch keine weite Verbreitung gefunden haben, ist der relativ große Aufwand bei der Herstellung solcher Anordnungen, falls die üblichen, bei "DNA-Chips" verwendeten, photolithographischen Syntheseverfahren auf planaren Trägern zum Einsatz kommen. Diese Verfahren machen sich im Falle der Nukleinsäuren die Tatsache zu Nutze, daß es nur 4 verschiedene natürlich vorkommende Nukleotide (Desoxyadenosin, Desoxycytidin, Desoxyguanosin und Thymidin) für den Aufbau von Desoxyribonukleinsäureoligomeren gibt, daß die Kopplungszeiten beim Aufbau der Oligonukleotide relativ kurz (weniger als 30 min) und die Ausbeuten der einzelnen Kopplungsschritte sehr gut (mehr als 99%) sind. Alle drei Kriterien haben entscheidenden Einfluss auf die Herstellungsdauer für solche Chips und damit die Wirtschaftlichkeit des gesamten Vorgangs.

Bei der photolithographischen Synthese von Oligonukleotiden wird zunächst ein mit einer photolabilen Schutzgruppe vollständig geschützter Träger an den Stellen, an

denen z.B. ein Thymidinphosphat aufgebracht werden soll, ortsgerichtet durch Bestrahlung mit Licht entschützt und dann der ganze Träger mit am 5'-OH photolabil geschütztem Thymidinphosphoamidit und geeigneten Kopplungsreagenzien inkubiert. Die Kopplung erfolgt so nur an den gewünschten Stellen und der ganze Prozess muss für die drei anderen Nukleotide wiederholt werden bevor das erste Dinukleotid synthetisiert werden kann. Bei einem Chip, der mit 20-mer Oligonukleotiden belegt wird, sind daher 80 Kopplungs-, Wasch- und Entschützungszyklen erforderlich.

Beim Peptid ist jedoch die Zahl der Komponenten, die zur Kopplung eingesetzt werden können, deutlich höher als im Falle der Nukleinsäuren. Es gibt 20 proteinogene Aminosäuren, einige natürlich vorkommende nicht-proteinogene Aminosäuren (z.B. Ornithin), die gleiche Zahl an entsprechenden D-Aminosäuren sowie eine kontinuierlich steigende Zahl von artifiziellen Aminosäuren, wie z.B. Cyclohexylalanin, Aminoisobuttersäure, Norvalin, etc., ebenfalls jeweils in D- und L-Form. Zusammengenommen kann davon ausgegangen werden, dass zur Zeit etwa 100 verschiedene Aminosäuren zur chemischen Synthese von Peptiden und Peptidomimetika zur Verfügung stehen. Werden - konservativ betrachtet - nur die Hälfte dieser Reagenzien zur Synthese einer Substanzbibliothek eingesetzt, ergeben sich 1.000 Kopplungs- und Entschützungszyklen bei der Synthese einer 20-mer Peptid- bzw. Peptidomimetikabibliothek. Darüberhinaus liefert die Festphasenpeptidsynthese in der Regel Kopplungsausbeuten von 85-90% bei Reaktionszeiten von etwa 30 min, so dass üblicherweise mindestens eine Wiederholung des Kopplungsschritts mit frischen Reagenzien notwendig ist, um die erforderlichen Syntheseausbeuten zu erzielen. Dies bedeutet, dass extrem lange Synthesenzeiten von Wochen bis hin zu mehreren Monaten für die Herstellung einer auf einem zweidimensionalen Träger immobilisierten Peptid oder Peptidomimetikabibliothek einkalkuliert werden müssen, wenn nach photolithographischen Verfahren vorgegangen wird. Folglich wurden bislang nur photolithographische Synthesen von kurzen Peptiden geringer Sequenzvariabilität beschrieben (S.P.A. Fodor et al. (1991), Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251:767-773, C.P. Holmes et al.

(1995), The use of light directed combinatorial peptide synthesis in epitope mapping. *Biopolymers* 37:199-211; M.C. Pirrung et al. (1992), Large scale photolithographic solid phase synthesis of polypeptides and receptor binding thereof US 5143854).

Ein alternatives Verfahren, das die Zahl der Arbeitsschritte erheblich reduziert, beruht auf der gleichzeitigen Entschützung aller trägergebundenen Reaktionspartner gefolgt von der parallelen oder sequentiellen ortsgerichteten Applikation der unterschiedlichen Aminosäurereaktionsmischungen in definierte Probenareale. Damit können auch Bibliotheken aus längeren und komplexen Peptiden oder Peptidomimetika in einem akzeptablen Zeitrahmen synthetisiert werden. Hauptproblem hierbei ist allerdings die zu erwartende Kreuzkontamination der Reaktanden, wenn die Probenareale dicht beieinander liegen. Eine dichte Packung der Probenareale wiederum ist wünschenswert, um die Substanzbibliothek ausreichend zu miniaturisieren.

Eine mögliche Lösung des Problems besteht in der Erhöhung der Grenzflächen-spannung in den Bereichen zwischen den Probenarealen des planaren Trägers, so dass die Reaktionsmischungen als kleine Tröpfchen im Bereich der Probenareale verharren. Um dieses Ziel zu erreichen, muss die Trägeroberfläche zwischen den Probenarealen fluoralkyliert werden, wie in T.M. Brennan (1995), Method and apparatus for conducting an array of chemical reactions on a support surface, US 5474796; T.M. Brennan (1997), Method and apparatus for conducting an array of chemical reactions on a support surface, EP 703 825B1 und T.M. Brennan (1999), Method and apparatus for conducting an array of chemical reactions on a support surface, US 5985551 beschrieben. Das Verfahren besitzt allerdings den Nachteil, dass die Tropfen ohne schützende Ummantelung stark der Verdunstung ausgesetzt sind, was insbesondere bei sehr kleinen Probenvolumina ein erhebliches Problem darstellen kann.

Eine alternative Lösung des Kreuzkontaminationsproblems besteht in der Ver-

wendung einer porösen Membran, die die Aminosäurereaktionsmischung am Ort der Applikation sofort aufsaugt (R. Frank (1992), Spot synthesis: an easy technique for the positionaly addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. Tetra hedron 48:92 17-9232; R. Frank und 5. Güler (1992), Verfahren zur schnellen Synthese von trägergebundenen oder freien Peptiden oder Oligonukleotiden, damit hergestelltes Flachmaterial, Verwendung sowie Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. WO 92/04366; J. Schneider-Mergener (1994), Verfahren zur Synthese und Selektionierung von Sequenzen aus kovalent verbundenen Bausteinen. WO 94/2052 1). Die ungeordneten Kapillaren in der porösen Membran führen bei zunehmender Miniaturisierung der Probenareale allerdings zu einer Kreuzkontamination und die relativ große Oberfläche der Membran führt auch bei diesem Verfahren zur Verdunstung des Lösungsmittels und damit u.U. auch zu einer Beeinträchtigung der Kopplungsreaktion. Ein weiteres Problem, das beim Einsatz der hier üblicherweise verwendeten Zellulosemembranen auftritt, ist eine zum Teil sehr starke Heterogenität des synthetisierten Produktes. Bei einer massenspektroskopischen Untersuchung des gesamten von einem Probenareal abgelösten Materials findet man sowohl aminoterminal als auch carboxyterminal verkürzte Peptide, die dadurch entstehen, dass aus sterischen Gründen innerhalb der Membran die Synthese zu früh abbricht und dass Kettenneustarts durch Veresterung von Aminosäuren direkt am Zellulosesubstrat auch in späteren Synthesesyklen noch stattfinden können. Es werden insbesondere um 1-4 Aminosäuren carboxyterminal verkürzte Peptide nachgewiesen (D. Goehmann und A. Frey, unveröffentlichte Resultate). Eine komplette Blockierung der Hydroxylgruppen der Zellulose durch Acetylierung oder ähnliche Maßnahmen zur Verhinderung von Kettenneustarts verbietet sich, da der Träger dadurch eine höhere Löslichkeit in den üblicherweise zur Festphasenpeptidsynthese verwendeten Lösungsmitteln gewinnt und erheblich an mechanischer Stabilität verliert (D. Goehmann und A. Frey, unveröffentlichte Resultate). Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von Membranen besteht in ihren optischen Eigenschaften. Insbesondere Zellulosemembranen weisen eine starke Eigenfluoreszenz im Emissionsbereich vieler handelsüblicher Fluorophore auf, so dass die Empfindlichkeit des

Nachweises von Wirkstoffen, die an die Zielmoleküle binden, stark reduziert ist (J. Helfmann, unveröffentlichte Resultate).

Ein weiterer Ansatz zur Lösung des Kreuzkontaminationsproblems bei der Beschickung eines planaren Trägers mit einer Substanzbibliothek besteht in der Verwendung eines Mikroreaktorsystems, bei dem der planare Träger eine Gefäßwand für eine Vielzahl von Reaktionskavitäten und zugleich das Trägermedium für die Zielmoleküle darstellt. Die so allseitig umschlossenen Reaktionskavitäten werden z.B. durch Umpositionieren des Mikroreaktorblocks oder mit Hilfe von Mikrokanälen, elektroosmotischen Pumpen und Mikroventilen im Reaktorblock gezielt mit den gewünschten Reagenzien und Waschlösungen versorgt. Abfallprodukte werden auf analoge Weise entfernt (J.L.Winkler et al. (1995), Very large scale immobilized polymer synthesis using 10 ine mechanically directed flow paths. US 5384261; P.J. Zanzucchi et al. (1997), Method of synthesis of plurality of compounds in parallel using a partitioned solid support. US 5643738; P.J. Zanzucchi et al. (1998), Partitioned microelectronic device array. US 5755942; S.C. Cherukuri et al. (1999), Method and system for inhibiting crosscontamination in fluids of combinatorial chemistry device. US 5980704). Ein entscheidender Nachteil solcher Anordnungen ist jedoch ihre Anfälligkeit gegen partikuläre Verunreinigungen in den Reaktionslösungen, insbesondere wenn die Kanäle nur wenige Mikrometer Durchmesser aufweisen und die Flussrichtung der Reagenzien und Abfallprodukte im Mikroreaktorblock mehrfach geändert wird. Die Gefahr einer Verstopfung des Mikroreaktorsystems ist insbesondere bei Kopplungsreaktionen mit Carbodiimiden sehr groß, da die hierbei entstehenden organischen Harnstoffderivate eine starke Tendenz zur Kristallisation aufweisen. Im ungünstigsten Fall muss dann der komplette Mikroreaktorblock ersetzt werden.

Die existierenden bzw. in der Literatur oder Patenten beschriebenen Verfahren weisen alle erhebliche Nachteile auf. Es wird entweder keine große Oberfläche und damit keine hohe Nachweisempfindlichkeit bei kleinen äußeren Abmessungen geboten oder die Synthesezeiten sind insgesamt zu lang. Der optische Nachweis wird durch

Eigenfluoreszenz stark gestört und Kettenabbrüche führen zu einer inhomogenen Probe. Bei dichter Packung der Substanzbibliothek ist eine Kreuzkontamination zwischen verschiedenen Probenarealen zu beobachten. Bei kleinen Volumina beeinflusst die Verdunstung die Ergebnisse. Die Handhabung ist umständlich oder sehr empfindlich gegen Partikel.

Erfindungsgemäße Lösung

Die Nachweisempfindlichkeit für die Wechselwirkung (z.B. Bindung) von Wirkstoffen in der Flüssigphase mit festphasen-gebundenen Zielmolekülen wird wesentlich bestimmt durch die Anzahl der festphasen-gebundenen Zielmoleküle. Bei einem ideal planaren Träger ist die zur Bindung zur Verfügung stehende feste Phase auf die äußere Oberfläche des Trägers begrenzt. Ein optisches Nachweissystem (z. B. Fluoreszenzdetektion) ist jedoch immer in der Lage, zusätzlich ein bestimmtes Volumen ober- und unterhalb der äußeren Oberfläche zu erfassen.

Gegenstand der Erfindung ist eine Anordnung bzw. ein Verfahren, wie in den Ansprüchen definiert. Besondere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen beansprucht und in der folgenden Beschreibung ausgeführt, ohne dass die Erfindung auf die gezeigten Ausführungsformen beschränkt wäre.

Die Erfindung betrifft allgemein eine Anordnung zur Aufnahme und zum Aufbau einer Substanzbibliothek und ein Verfahren zur Erstellung einer solchen Bibliothek. Unter "Substanzbibliothek" wird dabei eine Bibliothek oder Ansammlung vieler verschiedener, in der Regel aber ähnlicher, Substanzen gleicher Klasse verstanden. Die Bibliothek dient üblicherweise dazu, die dazu gehörenden Substanzen aufgrund irgendeiner Eigenschaft zu durchsuchen und passende Mitglieder oder Zielsubstanzen darin aufzufinden und ggf. zu selektieren. Beispiele für Substanzen, die eine erfindungsgemäße Substanzbibliothek bilden können und die auch als Zielmoleküle bezeichnet werden, sind unter anderem DNA-Sequenzen, Peptide, Polypeptide und peptoid Substanzen.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Struktur, die aus Glas, Quarz, Keramik, Kunststoff, Halbmetall oder Metall bestehen kann und durch eine hohe Dichte kleiner Kapillaren [1] (Durchmesser 5-100 μm) eine große innere Oberfläche mit einem Mehrfachen der äußeren Oberfläche besitzt (siehe Figur 1). Die gesamte Dicke dieser Kapillarplatte [4] (Dicke bis zu 10 mm) und damit die gesamte Länge der Kapillaren [1] und deren 15 Oberfläche wird durch eine Nachweisapparatur erfasst. Da die maximale Belegung (Anzahl von Molekülen) der Kapillarplatte [4] durch die Größe der inneren Oberfläche bestimmt ist, und diese im Vergleich zur äußeren Oberfläche um ein Vielfaches (100- bis 1000-fach) größer ist, erhöht sich im gleichen Maße die Nachweisempfindlichkeit bei Nutzung der Kapillarplatte [4] gegenüber einer planaren Probenanordnung.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass auf einer silanisierten Oberfläche in hoher Qualität peptidische und peptoid Moleküle synthetisiert werden können und die Zahl der Kettenneustarts fast vollständig eliminiert werden kann. Wenn zusätzlich noch ein verlängertes Ankermolekül, das als Abstandshalter dient, zwischen die Oberfläche und das Zielmolekül gekoppelt wird, werden die Kettenabbrüche stark reduziert und die Zugänglichkeit für die Wirkstoffe erheblich verbessert.

Zur Herstellung einer Bibliothek von Zielmolekülen, von der jede einzelne Spezies oder definierte Mischungen bestimmter Spezies an vorher definierte Bereiche der Kapillarplatte [4] synthetisiert oder gebunden werden, muss zunächst die innere Oberfläche der Kapillarplatte [4] zur kovalenten Bindung der Zielmoleküle befähigt werden. Dies geschieht durch Aufbringen einer Organosilanschicht, die funktionelle Gruppen zur Verankerung von peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen aufweist. Vorzugsweise wird dazu ein γ -Aminopropyltrialkoxysilan verwendet, es sind aber auch andere organofunktionelle Silane, wie z.B. γ -Mercaptopropyltrialkoxysilan, für diesen Zweck geeignet. Bei Verwendung von Metall- oder Halbmetallkapillarplatten muss zuvor eine Oxidschicht zur Bindung des Silans mittels Oberflächenoxidation der Kapillarplatte geschaffen werden.

Auf dieser organofunktionalisierten Kapillarplatte [4] wird dann durch ortsabhängiges Aufbringen (z.B. durch Pipettieren) einer Substanz jeweils ein Probenareal [3] angelegt. Bei der Substanz kann es sich im einfachsten Falle um ein Reagenz handeln, das die zur Bindung vorgesehenen funktionellen Gruppen der Organosilanschicht temporär schützt. In einer vorzugsweisen Ausführungsform wird allerdings ein Ankermolekül in den Probenarealen [3] aufgebracht, mit dem die Zielmoleküle zwischen 0,5 bis 20 nm über die innere Oberfläche der Kapillarplatte [4] hinausgehoben werden können, um so eine bessere Wirkstoffbindung zu ermöglichen. Als Ankerreagenz wird z.B. Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützter α -Amino-poly(ethylenglycol)- ω -propionsäure-N-hydroxybenzotriazolester verwendet.

Anschließend werden alle nicht mit Schutz- oder Ankerreagentien derivatisierten Bereiche der Kapillarplatte [4] chemisch so abgesättigt, dass dort zu einem späteren Zeitpunkt weder eine Synthese oder Kopplung von Zielmolekülen noch eine unspezifische Bindung von Wirkstoffen erfolgen kann. Die chemische Absättigung der Nicht-Probenareale kann je nach Erfordernis mit hydrophilen, hydrophoben oder oleophoben Gruppen erfolgen. Unter Standardbedingungen erfolgt die Absättigung mit Acetylresten.

In den folgenden Schritten zur erfindungsgemäßen Herstellung einer Substanzbibliothek, die sich auch einer Vielzahl von Probenarealen mit jeweils einer Spezies von Zielmolekülen zusammensetzt, wird die Schutzgruppe auf dem Träger oder den Ankermolekülen in allen Probenarealen [3] synchron entfernt und anschließend die Kopplung oder Synthese der peptidischen und peptoiden Zielmoleküle in den für sie vorgesehenen Probenarealen [3] durchgeführt.

Durch Kenntnis der Substanz, die an jedem Ort auf diese Weise gebunden bzw. synthetisiert wird, ist eine parallele Analyse der Wechselwirkungen von verschiedenen Zielmolekülen mit applizierten Wirkstoffen möglich. Voraussetzung dafür ist, dass keine wechselseitige Verunreinigung beim ortsabhängigen Aufbringen oder

Synthetisieren der Zielmoleküle geschieht.

In Weiterführung des Erfindungsgedankens wird dies durch die parallele Anordnung der senkrecht zur Plattenoberfläche verlaufenden Kapillaren [1], die nur zu den äußeren Plattenoberflächen hin offen sind, erreicht. Durch das somit erzielte Fehlen jeglicher Querverbindungen zwischen verschiedenen Probenarealen [3] werden Kreuzkontaminationen auch bei großer Dichte der Probenareale [3] erfolgreich verhindert. Ein Probenareal [3] umfasst mehrere (z.B. bis zu 4.000) Kapillaren [1]. Aufpipettierte Substanzen werden in die Kapillaren [1] gezogen, was je nach Flüssigkeit auch durch Erzeugung eines Unterdrucks auf einer Kapillarplattenseite unterstützt werden kann. Ein Fließen aus den Kapillaren [1] heraus über mehrere Kapillaren [1] hinweg in ein anderes Probenareal [3] ist ausgeschlossen, da die Flüssigkeit durch Kapillarkraft in der Kapillare gehalten wird. Ein Heraustropfen von Lösungen aus den Kapillaren [1] aufgrund sehr geringer Viskosität wird bei diesen Flüssigkeiten durch eine dicht an die Unterseite der Kapillarplatte [4] positionierte Platte [12] (Figur 2) mit hydro- und oleophober Oberfläche wirksam unterdrückt.

In Fortsetzung des Erfindungsgedankens ist aufgrund der nach beiden äußeren Plattenoberflächen hin offenen Kapillaren [1] auch eine einfache Automatisierung einer in der Kapillarplatte [4] durchgeführten Festphasenpeptidsynthese möglich. Dabei können nach Abschluss eines Kopplungsschrittes die Reagenzien und Abfallprodukte unidirektional durch Anlegen von Vakuum an die Unterseite der Kapillarplatte [4] aus den Kapillaren [1] herausgesaugt und die Kapillaren [1] durch Aufbringen von Waschlösungen auf der Oberseite der Kapillarplatte [4] synchron gespült werden. Für längere Inkubationen und Waschschrte können alle Reagenzien und Waschlösungen, die synchron auf alle Bereiche der Kapillarplatte [4] appliziert werden sollen, auch durch Fluten der gesamten Kapillarplatte [4] von der Unterseite her mit allen Kapillaren [1] in Kontakt gebracht und anschließend durch Anlegen von Unterdruck wieder entfernt werden. Eine Apparatur zur synchronen Applikation von Wasch- und Reagenzlösungen auf alle Bereiche der Kapillarplatte [4] ist in Figur 2 dargestellt.

Nachdem auf diese Weise ortsabhängig unterschiedliche Zielmoleküle auf den Probenarealen [3] synthetisiert oder gebunden worden sind, wird der gesamte Träger einem gelösten oder suspendierten partikulären Wirkstoff in der Flüssigphase ausgesetzt, wobei darauf geachtet werden muss, dass beim Einsatz von Suspensionen die Partikelgröße immer deutlich unter dem inneren Durchmesser der Kapillaren [1] liegt. Durch die Redundanz mit vielen Kapillaren je Probenareal stellen einzelne Partikel jedoch kein Verstopfungsrisiko für ein gesamtes Probenareal dar. Die Inkubation der Substanzbibliothek mit Wirkstofflösungen oder -suspensionen sowie Spülvorgänge davor und danach werden in einer bevorzugten Ausführungsform mit einem einfachen Aufbau durchgeführt, wie er in Figur 3 dargestellt ist.

Die Analyse der Wirkstoffbindung geschieht in einem bevorzugten Ausführungsbeispiel optisch anhand von Fluoreszenzmarkierungen durch Bindung eines Fluorophors an die Wirkstoffe. In einer alternativen Ausführungsform sind die Fluorophore an die Zielmoleküle gebunden. Zum Auslesen wird das einzelne Probenvolumen, das sich aus der Dicke der Kapillarplatte und dem Probenbereich [3] zusammensetzt, sowohl von Anregungslicht vollständig durchsetzt als auch von der Detektionsoptik vollständig erfasst. Die Vielzahl der Probenorte wird durch zeitlich sequentielles Abrastern erfasst, wobei entweder die Kapillarplatte zweidimensional unter der ortsfesten optischen Anordnung bewegt wird oder der Strahlengang über die Kapillarplatte bewegt wird. Die Verwendung von Quarz oder Glas als Material für die Kapillarplatte minimiert hier erfindungsgemäß den Einfluss der

Detaillierte Beschreibung der erfindungsgemäßen Lösung in einer bevorzugten Ausführungsform

Es wird beschrieben wie die gesamte Kapillarplatte vorbehandelt wird. Anschließend werden die Probenareale erzeugt und darauf die Substanzen synthetisiert. Für alle Vorgänge, der die Kapillarplatte vollständig ausgesetzt wird, wie z.B. Waschen, ist eine automatisierte Vorrichtung beschrieben. Diese Vorrichtung ist mit einem Pipettierroboter kombiniert, so dass die Kapillarplatte in der gleichen Vorrichtung

gewaschen und entschützt werden kann sowie die einzelnen Syntheseschritte durchgeführt werden können. Zur Untersuchung der Bindung eines Wirkstoffs an die Substanzbibliothek wird eine weitere Vorrichtung beschrieben, in die die Kapillarplatte eingelegt wird und mit dem Wirkstoff in Kontakt gebracht wird. Hierin wird gleichzeitig der optische Nachweis der Bindung durchgeführt.

Derivatisierung der Kapillarplatte zur Aufnahme der Substanzbibliothek

Die Kapillarplatte wird durch Ätzen aus homogenem Glas, in einem alternativen Verfahren aus heterogenem Glas, hergestellt. Das Oxidieren von Silizium und Metalloberflächen und Silanisieren von Glas-, Quarz-, Silizium-, Keramik- sowie oxidierten Silizium- oder Metalloberflächen ist Stand der Technik und wurde in der Fach- und Patentliteratur bereits vielfach beschrieben (z.B. zur Oberflächenoxidation eines Siliziumträgers: A.W. Flounders et al. (1997), Patterning of immobilized antibody layers via photolithography and oxygen plasma exposure. Biosensors Bioelectronics 12:447-456; z.B. zur Silanisierung: M. Lynn (1975), Inorganic support intermediates: covalent coupling of enzymes on inorganic supports. In: "Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides", H.H. Weetall, Hrsg., Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 1-48; H.M. Weetall (1976), Covalent coupling methods for inorganic support materials. Methods Enzymol 44:134-148).

In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird dazu eine unbehandelte Kapillarplatte [4] mit Oberflächenoxid-, Keramik- oder Glasbeschichtung entweder in einer oxidierenden Säure, wie z.B. Chromschwefelsäure oder heißer konzentrierter Salpetersäure, für eine Stunde von adsorbierten organischen Verbindungen befreit, fünf- bis zehnmal durch Durchsaugen von hochreinem Wasser (auf einer Nutsche, Glasfritte oder einer speziell für die Kapillarplatte [4] entwickelten Spülvorrichtung (Figur 2) gewaschen und bei 250 °C getrocknet.

Alternativ können anheftende organische Verbindungen durch Pyrolyse bei 500 °C in einer Sauerstoffatmosphäre entfernt werden. Nach dem Abkühlen wird die Kapillarplatte [4] für 18 Stunden bei Raumtemperatur in einer Lösung von 2% (v/v)

γ -Aminopropyltriethoxysilan in Wasser/Aceton (1:1) beschichtet, zehnmal durch Durchsaugen von Aceton gewaschen, trocknen lassen und über Nacht bei 120 °C gesintert.

Definition der Probenareale

Die Definition der Probenareale [3] ist im bevorzugten Ausführungsbeispiel ein zweistufiges Verfahren, wobei zuerst mit Hilfe eines programmierbaren Pipettierroboters Portionen einer Reaktionslösung mit Ankermolekülen in bestimmte Regionen der Kapillarplatte [4] pipettiert werden, die damit zu Probenarealen [3] werden. Im zweiten Schritt werden alle reaktiven Gruppen in den Nicht-Probenarealen mit Acetylresten abgesättigt.

Dazu werden jeweils ca. 0,4 bis 4000 nl einer Lösung, die einen zweifachen molaren Überschuß - bezogen auf die Anzahl der Aminofunktionen im entsprechenden Bereich der derivatisierten Kapillarplatte [4] - an α -FMOC-Amino-poly(ethylenglycol)propionsäure- ω -N-hydroxybenzotriazolester in N-Methylpyrrolidon enthält, in die künftigen Probenareale [3] der Kapillarplatte [4] pipettiert, für beispielsweise vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, jeweils dreimal durch Durchsaugen von Dimethylformamid und absolutem Ethanol gewaschen und unter Reinraumbedingungen im Luftstrom getrocknet. Zur Erhöhung der Kopplungsausbeute kann der gesamte Kopplungs- und Waschzyklus ein bis dreimal wiederholt werden. Der α -FMOC-Amino-poly(ethylenglycol)propionsäure- ω -N-hydroxybenzotriazolester wird unmittelbar zuvor z.B. durch Umsetzung von α -FMOC-Amino-poly(ethylenglycol)propionsäure mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) (z.B. im Verhältnis 1:1,2) oder in situ durch Umesterung von z.B. α -FMOC-Amino-poly(ethylenglycol)propionsäure- ω -N-hydroxysuccinimidester mit wasserfreiem N-Hydroxybenzotriazol und Diisopropylcarbodiimid (im Verhältnis 1:0,5:0,5) in N-Methylpyrrolidon hergestellt.

Im anschließend Absättigungsverfahren wird die gesamte Kapillarplatte [4] z.B. jeweils dreimal für je eine Stunde bei Raumtemperatur in fünf- bis zehnfachen

inneren Plattenvolumen einer Lösung von 2% (v/v) Acetanhydrid, 1% (v/v) Diisopropylethylamin in Dimethylformamid inkubiert, wobei die Platte alle 15 min so in der Lösung bewegt wird, daß sich die Reaktionslösung in den Kapillaren [1] austauscht. Danach wird die Kapillarplatte [4] auf einer Fritte oder Nutsche je dreimal mit Dimethylformamid und Ethanol gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

Im folgenden Entschützungsverfahren wird die abgesättigte Kapillarplatte [4] dreimal für je fünf Minuten bei Raumtemperatur in fünf bis zehn inneren Plattenvolumen einer Lösung von 20% (v/v) Piperidin in Dimethylformamid inkubiert. Danach wird die Kapillarplatte [4] wie oben beschrieben gewaschen und abschließend getrocknet.

Herstellung der Substanzbibliothek in den Probenarealen

Die Synthese der Substanzbibliothek von peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen verläuft semi- oder vollautomatisch nach dem Standard-FMOC-Syntheseverfahren für Zellulosefilter-immobilisierte Peptidbibliotheken (R. Frank (1992), Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. Tetrahedron 48:9217-9232), wobei die Lösungen, welche die aktivierten, aminoterminal und Seitenketten-geschützten Aminosäuren enthalten, mit Hilfe eines Pipettierroboters in die entsprechenden Probenareale [3] der Kapillarplatte [4] pipettiert und dort durch Kapillarkräfte in die Kapillaren [1] gezogen und für den Verlauf der Kopplungsreaktion inkubiert werden. Beim vollautomatischen Verfahren (siehe Figur 2) wird die Kapillarplatte [4] mit dem 5-fachen inneren Plattenvolumen an Dimethylformamid innerhalb von 30 sec überschichtet und die Reaktionsgemische gefolgt von der darübergeschichteten Waschlösung mit Unterdruck abgesaugt. Dann werden entweder die nicht reagierten Aminofunktionen mit Hilfe von Acetanhydrid blockiert oder nach weiterem Waschen der Kapillarplatte [4] in Dimethylformamid und Ethanol der gesamte Kopplungszyklus noch ein- bis dreimal wiederholt, bevor die nicht reagierten Aminofunktionen blockiert und

anschließend die FMOC-Schutzgruppen in den Probenarealen [3] der gesamten Kapillarplatte [4] entfernt werden. Dieser Syntheszyklus wird so lange wiederholt, bis die Peptide in der gewünschten Länge erhalten werden. Dann werden die Seitenketten der Aminosäuren entschützt, die gesamte Kapillarplatte [4] mit Dimethylformamid und Ethanol gewaschen, unter Reinraumbedingungen im Luftstrom getrocknet, unter Schutzgas (z.B. Argon oder Stickstoff) in eine Kunststoffolie eingeschweißt und bei -70 °C in Gegenwart von Trockenmittel gelagert bis sie für die weitere Untersuchung der Bindung von Wirkstoffen an die Substanzen auf der Kapillarplatte benötigt werden.

Alternativ dazu können auf die freien Aminofunktionen in den Probenarealen [3] der Kapillarplatte [4] auch z.B. Bromacetylreste zur Kopplung von thiol-haltigen Peptiden oder Aldehydreste zur Bindung von Proteinen aufgebracht werden. Welche Biokongjugatchemie hier optimal geeignet ist, hängt von den individuellen Erfordernissen der zu koppelnden peptidischen oder peptoidischen Zielmoleküle ab und kann an dieser Stelle nicht allgemeingültig beschrieben werden.

Vorrichtung zum vollautomatischen Waschen, Absättigen und Entschützen

Das vollautomatische Waschen, Absättigen und Entschützen ist die bevorzugte Ausführungsform bei der Herstellung der Substanzbibliothek. Es ist gegenüber einem manuellen Verfahren bevorzugt, da es Arbeitszeit und Reagenzien spart und die gesamte Synthese verkürzt und kosteneffizienter gestaltet (Figur 2).

Zur Montage wird die Kapillarplatte [4] auf das Unterteil eines Synthesetisches [6] gelegt, der fest mit einem Pipettierroboter verbunden ist. Dabei kommen die Randbereiche [5] der Kapillarplatte auf einer weichen, lösungsmittelresistenten Dichtung [7] zu liegen. Anschließend werden Abstandhalter [8] rings um die Kapillarplatte [4] dicht an die Randbereiche [5] herangeschoben und durch Gewindebolzen [9] gegen Verschieben gesichert, so daß die Kapillarplatte [4] auf dem Probentisch ortsfest positioniert ist. Danach wird das Oberteil des Synthesetisches [10] auf die Gewindebolzen [9] gesteckt und mit Hilfe einer Mutter

[11] gegen die Kapillarplatte [4] und den Abstandhalter [8] bzw. das Unterteil des Synthesetisches [6] gezogen, so daß die im Ober- und Unterteil des Synthesetisches [10 und 6] befindlichen Dichtungen [7] zusammengepreßt werden und die Kapillarplatte [4] zur Seite hin abdichten.

Für das Beschicken der Probenareale [3] wird der hydrophob und oleophob beschichtete Kolben [12] an die Unterseite der Kapillarplatte [4] herangeschoben, so daß keine Reaktionslösung während der Kopplungsreaktion nach unten aus der Kapillarplatte [4] austreten kann.

Zum Waschen nach Beendigung der Kopplungsreaktion wird die gesamte Kapillarplatte [4] aus den Waschlösungszuflüssen [13] mit Waschlösung überschichtet, der Kolben [12] nach unten bewegt und zur Entfernung der durch die Kapillarplatte [4] gesaugten Lösungen am Ablauf [14] Vakuum angelegt. Dann wird der Kolben [12] wieder an die Unterseite der Kapillarplatte [4] herangeschoben, die Kapillarplatte [4] wieder mit Waschlösung überschichtet und der Waschvorgang beliebig wiederholt (Figur 2A). Nach Abschluß des Waschvorgangs wird so lange Luft durch die Kapillarplatte [4.] gesaugt, bis alle Lösungsmittelreste verdunstet sind. Dann wird der Kolben wieder an die Kapillarplatte [4] herangeschoben und ein erneuter Pipettierzyklus durchgeführt, die Platte abgesättigt oder entschützt. Zum Absättigen nicht reagierter Aminofunktionen und zum Entschützen von Aminofunktionen wird der Kolben [12] nach unten geschoben und die Kavität, die durch Zurückziehen des Kolbens [12] unterhalb der Kapillarplatte [4] entsteht, mit der gewünschten Reaktionslösung durch den Reagenzienzufluß [15] befüllt. Bei verschlossenem Ablauf [14] und Reagenzienzufluß [15] wird der Kolben für die Dauer der Reaktion langsam auf- und abbewegt, so daß die Reaktionslösung in gleichmäßigem Fluß durch die Kapillaren [1] strömt und die Reaktion stattfinden kann (Figur 2B). Anschließend wird die Kapillarplatte [4] wie oben beschrieben gewaschen.

Vorrichtung zur Bindung von Wirkstoffen an die auf der Kapillarplatte immobilisierte Substanzbibliothek

Zur Untersuchung der Bindung von Wirkstoffen an die auf der inneren Oberfläche der Kapillarplatte [4] befindliche Substanzbibliothek ist eine Vorrichtung notwendig, mit der eine Wirkstofflösung oder -suspension gleichmäßig durch alle Kapillaren [1] gespült werden kann, so daß jede Wirkstoffkomponente mit jeder Zielmolekülspezies in Kontakt kommen kann (Figur 3).

Im bevorzugten Ausführungsbeispiel wird zur Montage die Kapillarplatte [4] auf das Unterteil des Inkubationstisches [16] gelegt. Dabei kommen die Randbereiche [5] der Kapillarplatte auf einer weichen Dichtung [17] zu liegen. Anschließend werden Abstandhalter [18] rings um die Kapillarplatte [4] gelegt, das Oberteil des Inkubationstisches [19] aufgesetzt und durch eine Klammer [20] mittels Andruckfedern [21] auf die Kapillarplatte [4] und den Abstandhalter [18] bzw. das Unterteil des Inkubationstisches [16] gedrückt, so daß die im Ober- und Unterteil des Inkubationstisches [19 und 16] befindlichen Dichtungen [17] zusammengepreßt werden und die Kapillarplatte [4] zur Seite hin abdichten. Dann wird ein Ultraschallgeber [22] in eine Ausparung des Abstandhalters [18] geschoben, bis er Kontakt mit dem Randbereich [5] der Kapillarplatte [4] hat.

Zur Beschickung der Vorrichtung wird der Kolben [23] nach unten geschoben und die Kavität, die durch Zurückziehen des Kolbens [23] unterhalb der Kapillarplatte [4] entsteht, mit der gewünschten Wirkstofflösung oder -suspension durch den Einfüllstutzen [24] befüllt. Das Volumen der Wirkstofflösung oder -suspension sollte mindestens das 1,5-fache des inneren Volumens der Kapillarplatte [4] plus das Volumen der über der Kapillarplatte [4] befindlichen Kavität [25] betragen.

Zur Inkubation wird bei geschlossenem Ablauf [26] und Einfüllstutzen [24] der Kolben [23] langsam nach oben bewegt, so daß die Luft aus den Kapillaren [1] in die Kavität [25] entweichen kann. Noch in Kapillaren [1] eingeschlossene Luft kann durch Beschallung mit dem Ultraschallgeber [22] entfernt werden. Wenn der Kolben [23] bis an die Kapillarplatte [4] herangeschoben wird, füllt sich die Kavität [25] vollständig mit Wirkstofflösung oder -suspension und sowohl die Luft als auch

überzählige Wirkstofflösung bzw. -suspension weichen durch seitliche Kanäle [27] in die Ausgleichsgefäße [28] aus. Durch wiederholtes Heben und Senken des Kolbens [23] mit kurzem Hub wird dann die Lösung oder Suspension in den Kapillaren [1] mit der in der Kavität [25] befindlichen Lösung oder Suspension gemischt und noch in der Kavität [25] befindliche Luftblasen schrittweise in die Ausgleichsgefäße [28] vertrieben.

Zum Entleeren der Vorrichtung wird der Kolben [23] so weit zurückgeschoben, daß der Ablauf [26] freikommt, durch den dann die Wirkstofflösung oder -suspension durch Anlegen von Unterdruck entfernt wird.

Das Waschen der Vorrichtung erfolgt in analoger Weise unter Verwendung geeigneter Waschlösungen.

Die orts aufgelöste Detektion der Wirkstoffreaktion mit den Zielmolekülen kann ebenfalls in der Vorrichtung erfolgen, da die über der Kapillarplatte [4] befindliche Kavität [25] nach oben durch ein transparentes Fenster [29] begrenzt wird und damit beispielsweise die Bindung oder die Abspaltung von Fluorophoren in der Vorrichtung mit Hilfe der in Figur 4 beschriebenen Meßeinrichtung detektiert bzw. verfolgt werden kann.

Vorrichtung zum Nachweis der Bindung von Wirkstoffen an Zielmoleküle

Nachweisverfahren für die Bindung von Molekülen sind in der Literatur und in Patenten vielfältig beschrieben, sie basieren meist auf der Verwendung von radioaktiven oder optischen Markern. Für den Nachweis von Bindungen in der Kapillarplatte werden optische Methoden die eine Durchdringung der Stege zwischen den Kapillaren erlauben, verwendet. Die vielfältigsten optischen Methoden basieren auf Fluoreszenzmarkierungen (z.B. M.V. Rogers (1997), Light on high-throughput screening: fluorescence-based assay technologies, Drug discovery Today 2:156-1 60). Die Fluoreszenzmarkierung wird durch Kopplung eines Fluorophors entweder an die Zielmoleküle oder an die Wirkstoffe hergestellt. Zum

Auslesen wird im bevorzugten Ausführungsbeispiel das einzelne Probenvolumen, das dem Probenareal [3] über die gesamte Dicke der Kapillarplatte entspricht, sowohl von Anregungslicht vollständig durchsetzt, als auch von der Detektionsoptik vollständig erfaßt. Um ein Übersprechen von benachbarten Probenarealen zu verhindern, wird zu einem Zeitpunkt nur ein Probenort beleuchtet und die Detektion nur auf einen Probenort begrenzt. Die Vielzahl der Probenorte wird durch zeitlich sequentielles Abrastern erfasst. Die Messung an einem Probenort kann sowohl kontinuierlich als auch mit repetierenden Pulsen geschehen. Im ersten Fall wird mit einer kontinuierlich abstrahlenden bandpaßgefilterten Lichtquelle oder einem Laser bestrahlt, wobei das schmalbandige Anregungslicht an die Absorption des Fluoreszenzmarkers angepaßt ist. Die Detektion geschieht schmalbandig im Bereich der Fluoreszenzemission des Fluoreszenzmarkers mit einem geeigneten Photodetektor. Bei der in Figur 4 dargestellten gepulsten Fluoreszenzanregung wird ein Laser [30] zur Beleuchtung eingesetzt, dessen Pulsdauer mindestens ein Drittel der

Lebensdauer des Markierungs-Fluorophors beträgt. Der kollimierte Strahl des Lasers [31] wird durch einen wellenlängenselektiven Strahlteiler [32] in Richtung auf die Kapillarplatte [4] reflektiert. Durch ein Objektiv [33] wird der Strahl so auf ein Probenareal [3] der Kapillarplatte [4] fokussiert, daß das gesamte Probenvolumen eines Probenareals [3] durchstrahlt wird. Das isotrop abgestrahlte Fluoreszenzlicht [34] der Fluoreszenzmarkierung wird durch das gleiche Objektiv [33] kollimiert und passiert den selektiven Strahlteiler [32] aufgrund der größeren Wellenlänge der Fluoreszenz. Durch ein schmalbandiges Filter [35] wird Streulicht des Anregungslasers stark unterdrückt, das Fluoreszenzlicht bei möglichst hoher Transmission aber durchgelassen. Mit einem weiteren Objektiv [36] wird das Fluoreszenzlicht auf den Photodetektor [37] fokussiert. Durch eine zeitaufgelöste Detektion mit einer Anstiegszeit von kleiner als einem Drittel der Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors kann das Fluoreszenzsignal besonders vorteilhaft in einer Zeittor-Integrationstechnik mit einem Boxcar-Integrator [38] nach Abklingen sowohl des elastischen Streulichts, als auch von Raman-gestreutem Licht erfaßt werden. Das Zeittor wird sinngemäß ca. nach der zweifachen Laserpulsdauer geöffnet und bleibt

für ca. die zweifache Fluorophorlebensdauer offen.

Ein Triggersignal vom Laser [39] liefert die Zeitbasis für das Zeittor. Mit Hilfe eines der Laserpulsenergie proportionalen Signals vom Laser [40] kann über einen zweiten Kanal des Boxcar-Integrators [38] eine Normierung des Fluoreszenzlichts und damit eine Korrektur für Schwankungen der Laserpulsenergie durchgeführt werden. In einem Rechner [41] werden alle Daten gesammelt und es kann abschließend eine Auftragung der Fluoreszenzintensität über dem jeweiligen Probenort dargestellt werden und eine Zuordnung der detektierten Signale zu den Zielmolekülen erfolgen.

Beschreibung der Figuren

Figur 1 enthält eine schematische Darstellung einer Kapillarplatte [4] in Aufsicht und als Schnitt. Die einzelnen Kapillaren [1] sind durch Stegbereiche [2] voneinander getrennt. Die Probenareale [3] umfassen eine Vielzahl von Kapillaröffnungen. Der Randbereich der Platte [5] enthält keine Kapillaren.

Figur 2 zeigt eine Vorrichtung zum vollautomatischen Waschen, Absättigen und Entschützen der Kapillarplatte [4] während der Synthese der Substanzbibliothek. Dabei ist die Kapillarplatte [4] zwischen Oberteil [10] und Unterteil [6] des Synthesetisches eingesetzt und mit Hilfe entsprechender Dichtungen [7] und Abstandhalter [8] über einen Gewindebolzen [9] mit Mutter [11] in ihrer Position fixiert. Im Oberteil des Synthesetisches [10] befinden sich Waschlösungszuflüsse [13], im Unterteil [6] Reagenzienzufluß [15] und Ablauf [14]. Ein Kolben [12] kann im Unterteil des Synthesetisches [6] bewegt und bis an die Unterseite der Kapillarplatte [4] geschoben werden.

Figur 3 zeigt eine Vorrichtung zur Bindung von Wirkstoffen an die auf der Kapillarplatte immobilisierte Substanzbibliothek. Die Kapillarplatte [4] ist zwischen Oberteil [19] und Unterteil [16] des Inkubationstisches eingesetzt und mit Hilfe entsprechender Dichtungen [17] und Abstandhalter [18] durch eine Klammer [20] mit Andruckfeder [21] in ihrer Position fixiert. Ein Ultraschallgeber [22] ist seitlich

an der Kapillarplatte [4] angebracht. Im Unterteil des Inkubationstisches befinden sich Einfüllstutzen [24] und Ablauf [26] für die Wirkstofflösungen, die mit einem Kolben [23] durch die Kapillarplatte [4] in die obere Kavität [25] gedrückt werden können. Seitliche Kanäle [27] führen aus der Kavität [25] in ein Ausgleichsgefäß, das zum Auffangen verdrängter Luft und überschüssiger Wirkstofflösung dient. Die Kavität [25] ist oben mit einem transparenten Fenster [29] abgeschlossen, so daß eine direkte optische Detektion von Reaktionen in der Vorrichtung möglich ist.

Figur 4 enthält eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zum Nachweis der Bindung von Wirkstoffen an die Substanzbibliothek mittels optischer Verfahren. Fluorophormarkierte Zielmoleküle auf der Kapillarplatte [4] werden durch einen von einem gepulsten Diodenlaser [30] erzeugten Laserstrahl [31], der durch einen wellenlängenselektiven Strahlteiler [32] und ein Objektiv [33] auf das Probenareal gelenkt wird, zur Fluoreszenz angeregt. Das abgestrahlte Fluoreszenzlicht [34] durchdringt den Strahlteiler [32], einen Bandpaßfilter [35] und ein weiteres Objektiv [36], bevor es auf den Photodetektor [37] auftrifft. Für die Integration des Fluoreszenzsignals innerhalb eines Zeittores erhält ein Boxcar-Integrator [38] vom Laser ein zeitliches Triggersignal [39] und zur Normierung des Fluoreszenzsignals ein der Laserenergie proportionales Signal [40]. Von einem Rechner [41] wird ein beweglicher Probentisch [42] so angesteuert, daß nacheinander die Probenareale gemessen werden können. Das normierte Fluoreszenzsignal wird über dem Probenort dargestellt.

Legende

- 1 Kapillare
- 2 Stegbereich zwischen Kapillaren
- 3 Probenareal
- 4 Kapillarplatte
- 5 Randbereich der Kapillarplatte
- 6 Unterteil des Synthesetisches
- 7 Lösungsmittelresistente Dichtung
- 8 Abstandhalter
- 9 Gewindebolzen
- 10 Oberteil des Synthesetisches
- 11 Mutter
- 12 Kolben
- 13 Waschlösungszufluß
- 14 Ablauf
- 15 Reagenzienzufluß
- 16 Unterteil des Inkubationstisches
- 17 Dichtung
- 18 Abstandhalter
- 19 Oberteil des Inkubationstisches
- 20 Klammer
- 21 Andruckfeder
- 22 Ultraschallgeber
- 23 Kolben
- 24 Einfullstutzen
- 25 Kavität
- 26 Ablauf
- 27 Kanal
- 28 Ausgleichsgefäß
- 29 Transparentes Fenster

- 30 Gepulster Diodenlaser
- 31 Laserstrahl
- 32 Strahlteiler
- 33 Objektiv
- 34 Abgestrahltes Fluoreszenzlicht
- 35 Bandpaßfilter
- 36 Objektiv
- 37 Photodetektor
- 38 Boxcar-Integrator
- 39 Triggersignal vom Laser
- 40 Der Laserpulsenergie proportionales Signal vom Laser
- 41 Rechner
- 42 Beweglicher Probenstisch

Im folgenden werden noch einige bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Anordnung bzw. des erfindungsgemäßen Verfahrens angegeben.

- A. Verfahren und Vorrichtung zur Untersuchung der molekularen Wechselwirkung von löslichen oder suspendierbaren Wirkstoffen mit festphasengebundenen peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen dadurch gekennzeichnet, daß die dafür notwendige Oberfläche innerhalb einer Platte in Form von Kapillaren geschaffen wird. Die Kapillaren von einer Plattenseite zur gegenüberliegenden Seite durchgehen, dabei aber untereinander nicht verbunden sind.
- B. Verfahren und Vorrichtung, wie gemäß A definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, daß eine Vielzahl von parallelen Kapillaren in der Platte angeordnet sind, die Flüssigkeiten durch Kapillarkraft in die Kapillaren ziehen und darin halten.
- C. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die

dadurch gekennzeichnet sind, dass die Kapillarplatte aus einem der Materialien Glas, Quarz, Silizium, Kunststoff, Halbmetall, Keramik, Metall oder einer Kombination dieser Materialien hergestellt ist.

- D. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die innere Oberfläche zur kovalenten Bindung von Zielmolekülen befähigt wird oder eine Synthese der Zielmolekülen erfolgt.
- E. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die innere Oberfläche durch eine Organosilanschicht, die funktionelle Gruppen zur Verankerung von peptidischen oder peptoiden Zielmolekülen aufweist, bedeckt ist.
- F. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass zur Silanisierung γ -Aminopropyltrialkoxysilan oder andere organofunktionelle Silane verwendet werden.
- G. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass bei Verwendung von Metall- oder Halbmetallkapillarplatten vor der Silanisierung eine Oxidschicht zur Bindung des Silans mittels Oberflächenoxidation der Kapillarplatte geschaffen wird.
- H. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass in der Kapillarplatte örtlich begrenzte Probenareale angelegt werden.
- I. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass eine Vielzahl von Probenarealen jeweils mit einem Durchmesser von bis zu 2.000 μm oder einer Anzahl von bis zu 4.000 benachbarten. Kapillaren auf einer Kapillarplatte angelegt werden.

- J. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Kapillaren eine Länge sowie die Kapillarplatte eine Dicke von 100 bis 2.000 μm besitzen.
- K. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass durch Aufpipettieren einer Substanz auf die Kapillarplatte die funktionelle Gruppe der Organosilanschicht temporär geschützt wird. Der so geschützte Bereich stellt ein Probenareal dar.
- L. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass durch Aufpipettieren eines Reagenz auf die Kapillarplatte ein geschütztes Ankermolekül an jeder Bindungsstelle des Probenareals entsteht, wobei das Ankermolekül gleichzeitig als Abstandshalter zur inneren Oberfläche dient.
- M. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass durch Aufpipettieren von Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützter α -Amino-poly(ethylenglycol)- ω -propionsäure-N-hydroxybenzotriazolester ein geschütztes Probenareal angelegt wird.
- N. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass alle nicht geschützten Bereiche der Kapillarplatte chemisch abgesättigt werden.
- O. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Schutzgruppen in den Probenarealen der gesamten Kapillarplatte entfernt werden.
- P. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass Peptide oder peptoiden Zielmoleküle orts-

abhängig sequentiell aus Aminosäuren in den Probenarealen der Kapillarplatte synthetisiert werden.

- Q. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die vollständigen peptiden oder peptoiden Zielmoleküle ortsabhängig in den Probenarealen der Kapillarplatte gebunden werden.
- R. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass durch die ortsabhängig unterschiedlichen Sequenzen von peptiden oder peptoiden Zielmolekülen eine Substanzbibliothek aufgebaut wird.
- S. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass auf mindestens einer Seite der Kapillarplatte ein mit einem Ventil versehenes geschlossenes und variables Volumen existiert, in das Flüssigkeiten mit löslichen oder suspendierbaren Wirkstoffen sowie andere Flüssigkeiten und Gase eingelassen werden können und abgesaugt werden können.
- T. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass durch Ankopplung von Ultraschall an die Kapillarplatte Gasblasen gelöst werden können.
- U. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass durch Ankopplung von Ultraschall die Reaktionsgeschwindigkeiten in den Kapillaren erhöht werden.
- V. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Bindung der Wirkstoffe an die Zielmoleküle nachgewiesen wird.

- W. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass eine Veränderung der Zielmoleküle durch die Wirkstoffe bewirkt und nachgewiesen werden kann.
- X. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Kapillarplatte transparent oder opaque ist und einer optischen Messung frei zugänglich ist.
- Y. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass lösliche oder suspendierbare Wirkstoffe fluoreszenzmarkiert sind und in die Kapillaren eingebracht werden.
- Z. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass nach einer bestimmten Zeit die nichtgebundenen Wirkstoffe entfernt werden und die gebundenen Wirkstoffe anhand der Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden.
- AA. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die festphasen-gebundenen peptidischen oder peptoiden Zielmoleküle fluoreszenzmarkiert sind.
- BB. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass lösliche oder suspendierbare Wirkstoffe, Säuren oder andere Flüssigkeiten in die Kapillaren gespült werden, nach einer bestimmten Zeit wieder ausgespült werden und das Vorhandensein der noch gebundenen fluoreszenzmarkierten Zielmoleküle nachgewiesen wird.
- CC. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Fluoreszenzmarkierung mit Licht im UV, im Sichtbaren oder nahen Infrarot angeregt und detektiert wird.

- DD. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Fluoreszenzanregung mit einem gepulsten Diodenlaser mit einer Pulsdauer von weniger als 10 ns geschieht.
- EE. Verfahren und Vorrichtung wie in den vorherigen Abschnitten definiert, die dadurch gekennzeichnet sind, dass der Nachweis der Fluoreszenz zur Unterdrückung von Streulicht in einem Zeittor nach Abklingen des Anregungspulses geschieht.

Korrigierte Patentansprüche

1. Anordnung zur Aufnahme oder zum Aufbau einer Substanzbibliothek, die einen Körper aufweist, der von einer Vielzahl von Kapillaren durchdrungen ist zur Aufnahme einzelner Substanzen der Substanzbibliothek oder von deren Vorläufern.
2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Kapillaren parallel, bevorzugt senkrecht durch den Körper erstrecken, wobei mindestens eine Öffnung der Kapillaren frei zugänglich ist, um Flüssigkeit in die Kapillaren ziehen und darin halten zu können.
3. Anordnung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzbibliothek eine Bibliothek von Zielmolekülen, insbesondere eine Peptid-, Polypeptid- oder DNA-Bibliothek ist.
4. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest die innere Oberfläche der Kapillaren mit einer Schicht, insbesondere einer Organosilanschicht, überzogen ist, die zur kovalenten Bindung von Zielmolekülen geeignete funktionelle Gruppen aufweist.

5. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Kapillaren aufweisenden Körper örtlich begrenzte Einzelareale mit jeweils einer Gruppe von Kapillaren gebildet sind.
6. Anordnung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die außerhalb der Einzelareale liegenden Bereiche chemisch abgesättigt sind.
7. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Körper transparent oder opaque ist und für eine optische Messung verwendbar ist.
8. Verfahren zum Aufbau einer Substanzbibliothek, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) die Kapillaren in einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 mit einer funktionellen Gruppen tragenden Schicht überzogen werden unter Ausbildung festphasengebundener funktioneller Gruppen,
 - b) in vorbestimmten Bereichen für die Bindung vorgesehene funktionelle Gruppen aktiviert bzw. entschützt werden,
 - c) zum Aufbau der gewünschten Substanz geeignete Reagenzien bzw. Untereinheiten, ggf. in aktivierter und/oder geschützter Form, mit den vorbestimmten Bereichen in Kontakt gebracht werden, unter solchen Bedingungen, dass jeweils eine kovalente Bindung mit der festphasengebundenen funktionellen Gruppe ausgebildet wird,
 - d) anschließend überschüssige Reagenzien entfernt werden und
 - e) die Schritte b) bis d) nach Bedarf wiederholt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass als zum Aufbau geeignete Reagenzien Aminosäuren, ggf. mit geschützten funktionellen Gruppen oder modifizierte Aminosäuren verwendet werden.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass durch Aufpipettieren eines Reagenz auf den Kapillarkörper an jeder

Bindungsstelle, die Zielmoleküle aufnehmen soll, ein geschütztes Ankermolekül entsteht, das bevorzugt gleichzeitig als Abstandshalter dient.

11. Verfahren zur Untersuchung einer molekularen Wechselwirkung zwischen Wirkstoffen und festphasengebundenen Zielmolekülen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zielmoleküle in Kapillaren auf einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 gebunden sind und vorbestimmte Bereiche des Kapillarkörpers mit den Wirkstoffen in Kontakt gebracht werden, wobei die Wirkstoffe bevorzugt in gelöster oder suspendierter Form vorliegen.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Zielmoleküle oder Wirkstoffe mit einer Markierung versehen sind, die durch die Bindung eines Wirkstoffs an ein Zielmolekül nachweisbar verändert wird.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung oder Nichtbindung eines Wirkstoffes an ein Zielmolekül optisch, bevorzugt durch Fluoreszenz oder Fluoreszenzlöschung, nachgewiesen wird.

1/4

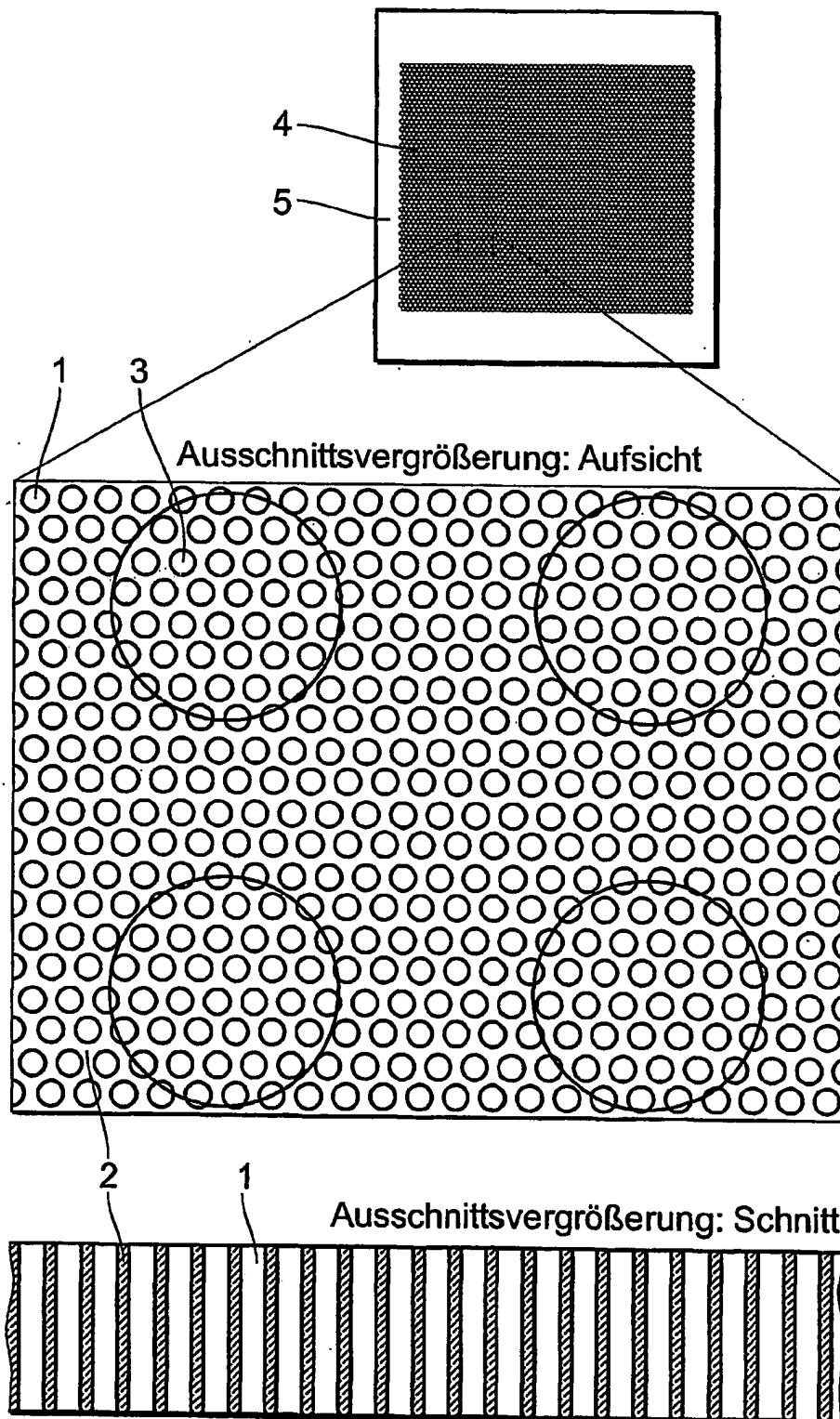


Fig. 1

2/4

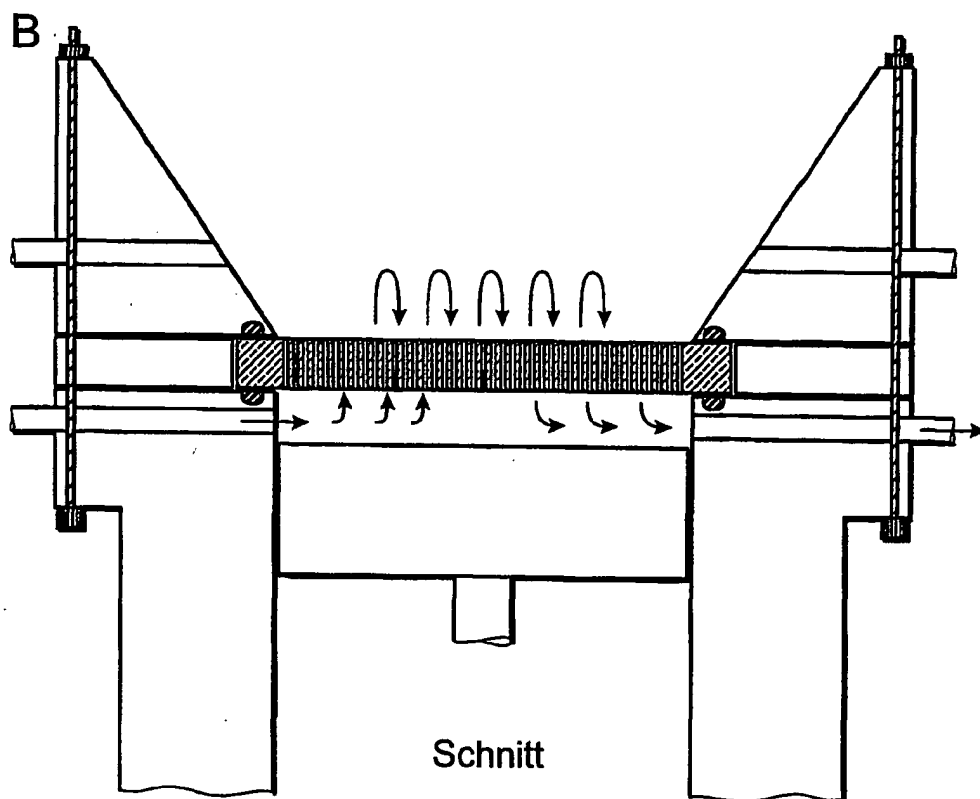
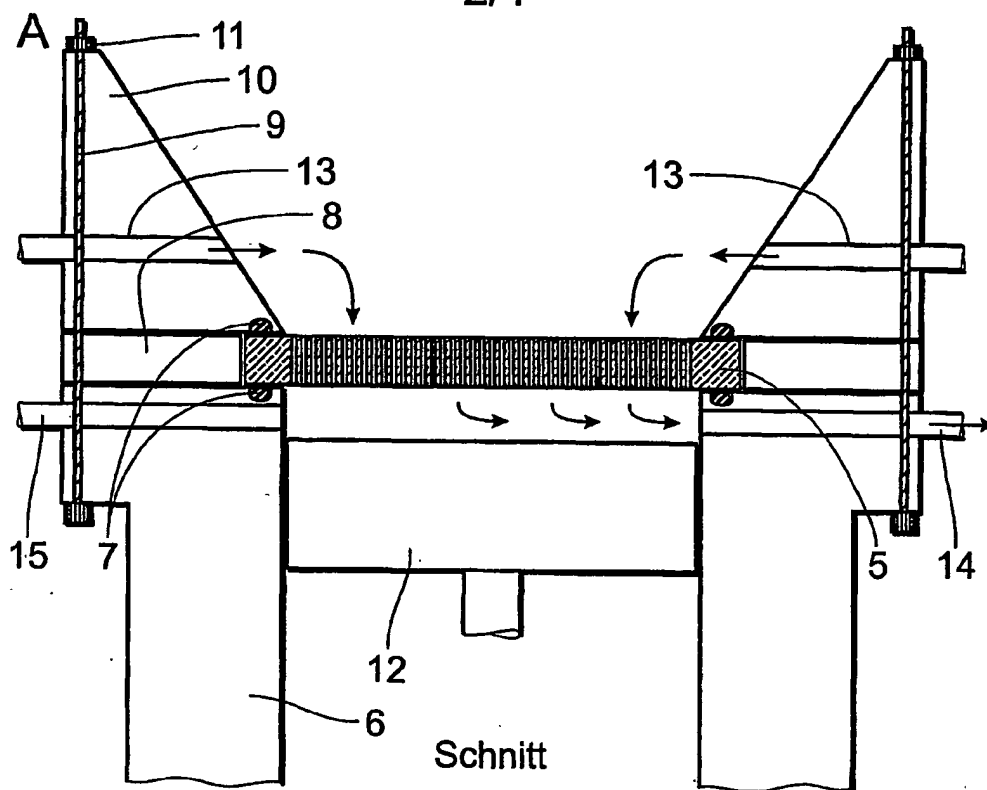


Fig. 2

3/4

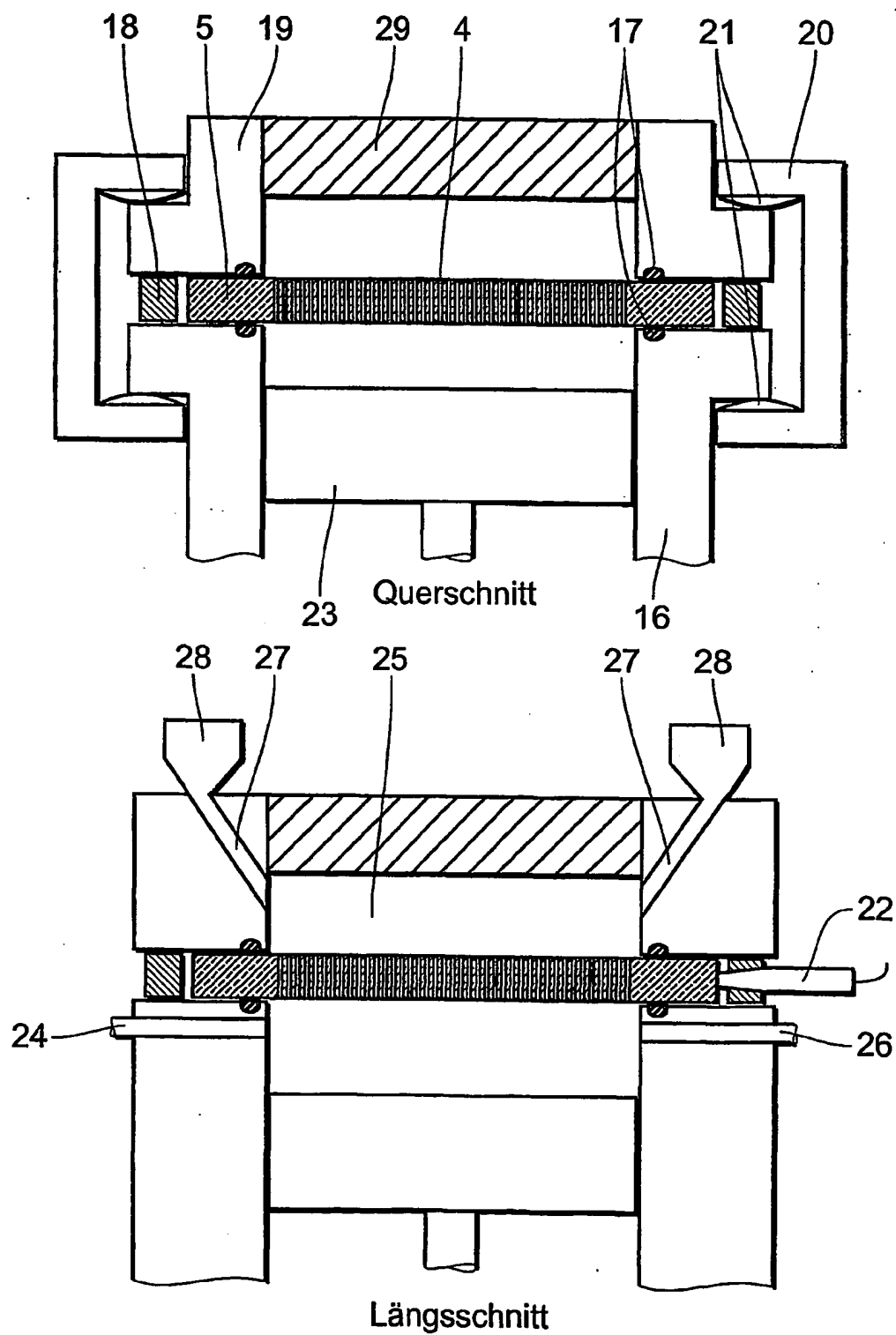


Fig. 3

4/4

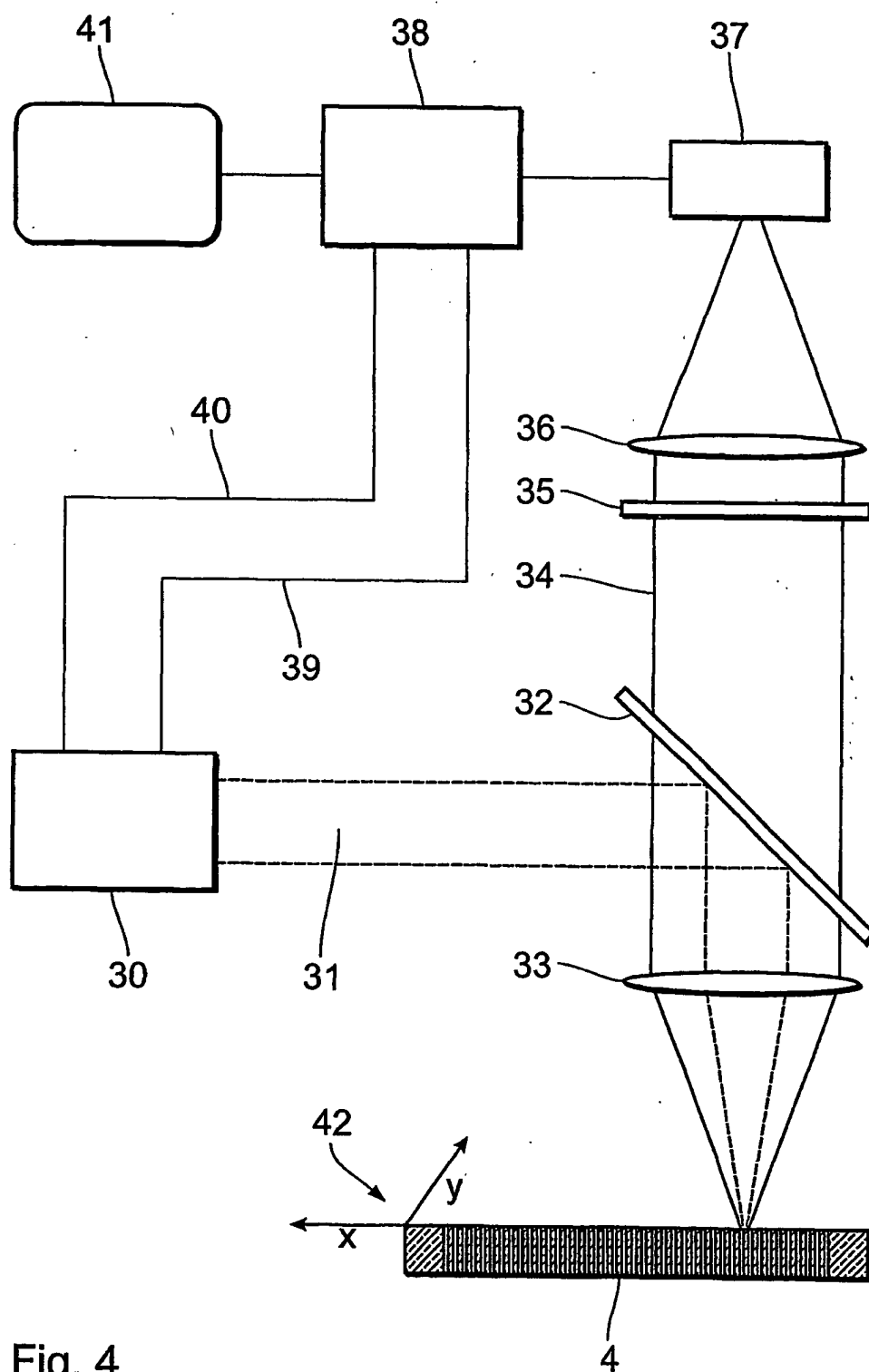


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03530

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01J19/00 C07K1/04 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J C07K C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 763 263 A (PETER J. DEHLINGER) 9 June 1998 (1998-06-09) abstract column 3, line 54 -column 4, line 31 column 4, line 38 -column 5, line 34 column 7, line 50 -column 11, line 27 column 13, line 56 -column 14, line 32 column 15, line 55 -column 19, line 40 figures ---	1-12
P, X	WO 00 66259 A (UT-BATTELLE, LLC) 9 November 2000 (2000-11-09) the whole document ---	1,8,10
X	US 5 759 779 A (PETER J. DEHLINGER) 2 June 1998 (1998-06-02) the whole document ---	1-12
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 2001

Date of mailing of the international search report

18/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stevnsborg, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03530

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 5 798 035 A (GREGORY L. KIRK & ROBERT H. GRUBBS) 25 August 1998 (1998-08-25) the whole document</p> <p>-----</p>	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03530

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5763263 A	09-06-1998	US 5759779 A AU 7731196 A CA 2238303 A EP 0876206 A WO 9719749 A	02-06-1998 19-06-1997 05-06-1997 11-11-1998 05-06-1997
WO 0066259 A	09-11-2000	AU 4698600 A	17-11-2000
US 5759779 A	02-06-1998	US 5723320 A AU 7731196 A CA 2238303 A EP 0876206 A WO 9719749 A US 5763263 A	03-03-1998 19-06-1997 05-06-1997 11-11-1998 05-06-1997 09-06-1998
US 5798035 A	25-08-1998	AU 3382397 A WO 9814770 A US RE37194 E	24-04-1998 09-04-1998 29-05-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03530

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01J19/00 C07K1/04 C07H21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01J C07K C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 763 263 A (PETER J. DEHLINGER) 9. Juni 1998 (1998-06-09) Zusammenfassung Spalte 3, Zeile 54 - Spalte 4, Zeile 31 Spalte 4, Zeile 38 - Spalte 5, Zeile 34 Spalte 7, Zeile 50 - Spalte 11, Zeile 27 Spalte 13, Zeile 56 - Spalte 14, Zeile 32 Spalte 15, Zeile 55 - Spalte 19, Zeile 40 Abbildungen ---	1-12
P, X	WO 00 66259 A (UT-BATTELLE, LLC) 9. November 2000 (2000-11-09) das ganze Dokument ---	1, 8, 10
X	US 5 759 779 A (PETER J. DEHLINGER) 2. Juni 1998 (1998-06-02) das ganze Dokument ---	1-12
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. September 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/09/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stevnsborg, N

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03530

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 798 035 A (GREGORY L. KIRK & ROBERT H. GRUBBS) 25. August 1998 (1998-08-25) das ganze Dokument -----	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03530

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5763263 A	09-06-1998	US 5759779 A	02-06-1998
		AU 7731196 A	19-06-1997
		CA 2238303 A	05-06-1997
		EP 0876206 A	11-11-1998
		WO 9719749 A	05-06-1997
WO 0066259 A	09-11-2000	AU 4698600 A	17-11-2000
US 5759779 A	02-06-1998	US 5723320 A	03-03-1998
		AU 7731196 A	19-06-1997
		CA 2238303 A	05-06-1997
		EP 0876206 A	11-11-1998
		WO 9719749 A	05-06-1997
		US 5763263 A	09-06-1998
US 5798035 A	25-08-1998	AU 3382397 A	24-04-1998
		WO 9814770 A	09-04-1998
		US RE37194 E	29-05-2001